第17卷 第2期 昆 虫 学 报 Vol. 17, No. 2
1974 年 5 月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA May, 1974

苏芸金杆菌晶体的区别染色法

戴 冠 群
(广 东 农 林 学 院)

苏芸金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的晶体是具有特异性的细胞内含物,也是该菌的一种特征。因此,晶体的存在与否,可考虑作为苏芸金杆菌类生物制剂的常规检验项目之一。早在1911年,Berliner 首次从地中海粉螟中分离出这种细菌时,已报道有晶体的存在;随后,Mattes (1927) 对此亦有记载。但是,关于晶体的染色特性以及其与昆虫致病的关系,只是在1953年 Hanney 的工作中,才为人们所注意。他发现苏芸金杆菌的晶体经过水解处理后,易为苯胺染料——结晶紫、碱性复红、维多利亚蓝以及姬姆萨染液所染色。另外,以苯胺黑作菌体负染色法,于暗视野中亦可观察晶体的存在。此后,1961年 Smirnoff 鉴于负染色法在苏芸金杆菌早期细胞内不易察出晶体的形成;用孔雀绿芽胞染色法也不能显著地区别晶体。因而,他改进了后一方法,用相差接物镜和暗视野配合使晶体、芽胞和菌体细胞三者区别开来。这种方法误差小,甚至很小的晶体亦可察出。其后,Smirnoff (1962)、Benz 和 Borusiewicz (1963) 相继采用了萘酚蓝黑 (naphthol blue black) 作为主要染色剂,并以碱性复红或番红复染,可以达到区别晶体、芽胞和菌体细胞三者的目的。但是,上述3种区别染色法或需要用精密的显微镜,或染色剂配制不便(不能即时应用),因此,需要有更简便、灵敏的晶体染色方法。

Durrum (1950) 曾第一次用溴酚蓝作为蛋白质微量分析的显色剂。随后,Kunkel 和 Tiselius (1951),Geschwind 和 Li (1952) 相继发展了 Durrum 的工作,认为溴酚蓝在蛋白质分析时有灵敏的指示效果。Mazia (1953) 首先把溴酚蓝的显色作用应用到生物学上来,作为细胞内蛋白质的染色剂。同年,Xeros 用它来观察核多角体病毒在幼虫细胞内发展情况,都具有良好的效果。因之,作者采用了溴酚蓝 (brom phenol blue),即四溴苯酚磺酞 (tetrabromophenol sulfonphthalein) 作为苏芸金杆菌晶体的生物染色剂。

试剂的配制:$HgCl_2$ 10克,溶于100毫升的95%酒精中,待其充分溶解后,再加入溴酚蓝100毫克。保存备用(以下简称此液为 MBB 液)。

复染液:番红 (safranin) 水溶液。按细菌学常法配制。

染色方法:按常法把需检材料涂成薄片,待其自然干燥。然后于涂片中央滴加一小滴 MBB 液。试剂即向四周扩散。须臾干燥并有白色结晶析出。5—6分钟后即用蒸馏水(或清水)轻轻洗去多余之染色剂。再滴加复染液约30秒钟,水洗。待干后就可用显微镜检视。由于染色试剂 MBB 液中含有 $HgCl_2$ 及酒精。按染色制片理论不需再加热固定。固定及染色二步手续可一次完成。

结果:细菌的晶体呈深天蓝色,芽胞无色,细菌细胞呈复染的浅红色(图1)。晶体由于含有蛋白质,故具有 MBB 液所特有的颜色反应。因此能清晰地与芽胞、菌体细胞区别开来。不仅离体晶体染色显明,就是菌体细胞内晶体亦由于染色上的反差而清晰地区别开来。

溴酚蓝很少用作生物染料之用,它的染色作用原理可能在于它能与晶体蛋白质中自由 $-NH_2$ 结合,而获得清晰的细胞学形象。

本染色法之特点,作者认为:(1)染色剂种类不多,且配制简单,配后即可应用;(2)涂片染色时简便迅速;(3)染色反差显明而有区别效果。

参 考 文 献

Bailey, J. L. 1962 Techniques in protein chemistry. pp: 276—7.

Benz, G. & K. Borusiewicz 1963 A method for differential staining of spores and parasporal bodies of *Bac. thuringiensis* Berliner, and *Bac. friboucgensis* wille. *J. Ins. Path.* 5:393—4.

Durrum, E. L. 1950 A microelectrophoretic and microionophoretic technique. *J. Amer. Chem. Soc.* 72:2493—8.

Geschwind, I. R. & C. H. Li 1952 The reac-

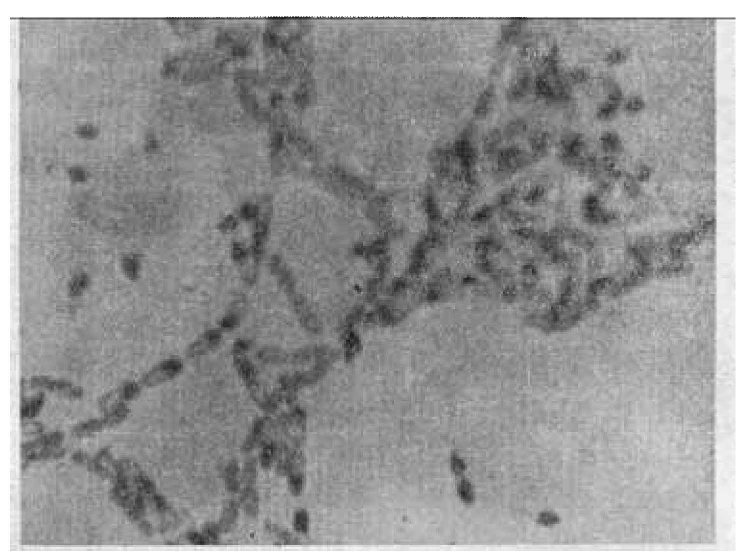


图 1 苏芸金杆菌的晶体(黑色)和细菌菌体(灰色),芽胞未染上色 ×2,000 (本院潘坤清同志协助显微摄影)

tion of bromphenol blue with amino acids and peptides *J. Amer. chem. Soc.* **74**: 834—5.

Hanney, C. L. 1953 Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria. *Nature* **172**:1004.

Hanney, C. L. 1957 The parasporal body of *Bac. laterosporus* Laubach. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**:1001—10.

Hanney, C. L. 1961 Fowler's bacillus and its parasporal body. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**:285—98.

Kunkel, H. G. & A. Tiselius 1951 Electrophoresis of proteins on filter paper. *J. Gen. Physiol.* **35**:89—118.

Mazia, D., P. A. Brewer & M. Alfert 1953 The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue. *Biol. Bull.* **104**:57—67.

Menzies, D. W. 1961 Bromphenol blue as a stain for muscle striations. *Stain Tech.* **36**:285—7.

Smirnoff, W. A. 1961 Color refraction in dark field to detect parasporal bodies of crystalliferous bacteria. *J. Ins. Path.* **3**: 216—7.

Smirnoff, W. A. 1962 A Staining method for differentiating spores, Crystals and cells of *Bac. thuringiensis* (Berliner). *J. Ins. Path.* **4**:384—6.

Xeros, N. 1953 Development of intranuclear inclusions in virus diseased cells of lepidopterous larvae. *Nature* **172**:309—10.